

ts

PATENT

Docket No.: 10235/11

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

APPLICANTS : Masayoshi MURAMATSU et al.

SERIAL NO. : 10/022,695

FILED : 20 December 2001

FOR : METHOD FOR PRODUCTION OF  
GERANYLGERANIOL AND ANALOGOUS  
COMPOUNDS THEREOF BY MICROORGANISMS



GROUP ART UNIT : Unknown

Examiner : Unassigned

ASSISTANT COMMISSIONER  
FOR PATENTS  
Washington, DC 20231

**CLAIM TO CONVENTION PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119**

SIR:

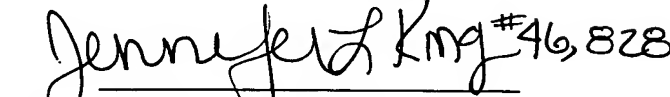
Applicant hereby claims the Convention Priority Dates of Japanese Patent Application Nos. 2000-401266 filed in Japan on 28 December 2000 and No. 2001-376173 filed 10 December 2001. Certified copies of said Japanese Patent Applications are submitted herewith.

Respectfully submitted,

Dated: 22 March 2002

KENYON & KENYON  
1500 K Street, N.W., Suite 700  
Washington, DC 20005

Tel: (202) 220-4200  
Fax: (202) 220-4201

  
Judith L. Toffenetti  
(Reg. No. 39,048)

(Translation)



PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: December 28, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 401266/2000

Applicant(s): TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA

September 25, 2001

Commissioner,  
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2001-3088035

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2000年12月28日

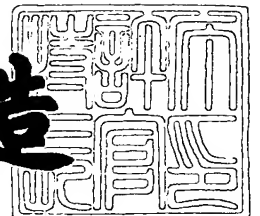
出 願 番 号  
Application Number: 特願2000-401266

出 願 人  
Applicant(s): トヨタ自動車株式会社

2001年 9月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3088035

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00-0751

【提出日】 平成12年12月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/18

【発明の名称】 微生物によるゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物  
の製造方法

【請求項の数】 2

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

    【氏名】 村松 正善

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

    【氏名】 小畑 充生

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市右京区常盤山下町6-9

    【氏名】 清水 昌

【特許出願人】

    【識別番号】 000003207

    【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096183

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物によるゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下のいずれかの属に属するゲラニルゲラニオール及び／又はファルネソール生産菌を培地に培養し、ゲラニルゲラニオール及び／又はファルネソールを菌体内外に生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、ゲラニルゲラニオール及び／又はファルネソールの製造方法。

サッカロミセス (Saccharomyces) 属

サッカロミコシス (Saccharomycopsis) 属

サッカロミコデス (Saccharomycodes) 属

シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 属

ヴィッカーハミア (Wickerhamia) 属

デバリオミセス (Debaryomyces) 属

ハンゼヌラ (Hansenula) 属

ハンゼニアスポーラ (Hanseniaspora) 属

リボミセス (Lypomyces) 属

ピキア (Pichia) 属

クロッケラ (Kloeckera) 属

カンジダ (Candida) 属

ザイゴサッカロミセス (Zygosaccharomyces) 属

オガタエア (Ogataea) 属

クライシア (Kuraishia) 属

コマガタエラ (Komagataella) 属

ヤロウヴィア (Yarrowia) 属

ウィリオプシス (Williopsis) 属

ナカザワエア (Nakazawaea) 属

クリベロマイセス (Kluyveromyces) 属

トルラスポーラ (Torulaspora) 属

シテロマイセス(Citeromyces) 属

ウォルトマイセス(Waltomyces)属

バチルス (Bacillus) 属

スタフィロコッカス(Staphylococcus)属

シュードモナス(Pseudomonas) 属

マイクロコッカス (Micrococcus)属

エキシグオバクテリウム (Exiguobacterium)属

ムコール (Mucor)属

【請求項2】 以下のいずれかの属に属するネロリドール生産菌を培地に培養し、ネロリドールを菌体内外に生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、ネロリドールの製造方法。

サッカロミセス (Saccharomyces)属

クリプトコッカス(Cryptococcus)属

カンジダ(Candida) 属

ストレプトマイセス(Streptomyces)属

ノカルディア (Nocardia) 属

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物を利用するゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ゲラニルゲラニオール、ファルネソールは、生物ではゲラニルゲラニルピロリン酸、ファルネシルピロリン酸がフォスファターゼによって加水分解を受けることにより生成すると考えられる。ゲラニルゲラニルピロリン酸は、ゲラニルゲラニオールのピロリン酸エステルで、イソペンテニルピロリン酸とファネシルピロリン酸の縮合または3分子のイソペンテニルピロリン酸とアリアルピロリン酸の縮合により得られる。ゲラニルゲラニルピロリン酸は、環化反応によりジベレリ

ンなどのジテルペンへ、尾部と尾部で縮合してフィトエンを生成したのちカロチノイドへ、またイソペンテニルピロリン酸と頭部と尾部で縮合してポリプレニルピロリン酸などへと代謝される。一方、ファルネシルピロリン酸はイソペンテニルピロリン酸とゲラニルピロリン酸の縮合または2分子のイソペンテニルピロリン酸とアリールピロリン酸の縮合により生じ、環化反応によりセスキテルペンに、尾部と尾部との縮合によりスクアレンになったのち、ステロイド及びトリテルペンに、またイソペンテニルピロリン酸と頭部と尾部で縮合してポリプレニルピロリン酸やドリコールに代謝される。また、Ras タンパク質やGタンパク質などある種のタンパク質のシステインと結合してプレニル化タンパク質に代謝される。このように、ゲラニルゲラニオール、ゲラニルゲラニルピロリン酸、及びこれらの前駆体であるファルネシルピロリン酸、ファルネソール、ゲラニルピロリン酸、ゲラニオールなどの一連のゲラニルゲラニオール誘導体は、テルペン類、カロチノイド類、ステロイド類の生合成中間体として中心的な化合物である。また、ゲラニルゲラニオールおよびその類縁化合物は香料、抗腫瘍活性を有するタキサン類の製造（特願平8-227481号）、養毛剤（特願平8-180449号）、骨粗鬆症治療剤（特願平9-294089号）など、重要な用途がある。

### 【 0 0 0 3 】

上記のようなゲラニルゲラニオール誘導体に関し、これまで、トウダイグサ科に属する植物細胞を光照射下で培養してゲラニルゲラニオール及び／又はゲラニルゲラニルピロリン酸を生産させた例（特開平9-238692号公報）、*Saccharomyces cerevisiae* のerg 変異株がファルネソールを分泌生産する例 [Curr. Genet., 18, 41-46 (1990)] の報告があるが、自然界にゲラニルゲラニオールやファルネソール生産菌が存在するという報告はない。前記従来技術のうち、植物細胞による例では培養に光照射が必要である上、培地成分が高価で量産が困難である。また、erg 変異株による例では、酵母の生育に必要なエルゴステロールを合成することができないため自然界に存在することは難しく、またエルゴステロール要求性であることから培地中に高価なエルゴステロールを添加しなければならない。これに対し、植物細胞に比べ増殖速度が速く、かつ特別な成分を加えずとも安価な培地で生育できるゲラニルゲラニオールやファルネソールを生産する



野性株が存在すれば、上記有用物質の中間体の量産が可能となって、産業上非常に有用である。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の課題は、ゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物を生産することのできる微生物を用いて、大量にかつ安価にゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物を製造する方法を提供することにある。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するべく検討を重ねた結果、属種が同定されている微生物を中心に広くスクリーニングした結果、ゲラニルゲラニオール、ファルネソール、ネロリドールを生産することのできる酵母菌（子囊菌酵母類、不完全菌酵母類）、細菌、放線菌、糸状菌を見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 6 】

すなわち、本発明は、以下のいずれかの属に属するゲラニルゲラニオール及び／又はファルネソール生産菌を培地に培養し、ゲラニルゲラニオール及び／又はファルネソールを菌体内外に生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、ゲラニルゲラニオール／又はファルネソールの製造方法である。

サッカロミセス (Saccharomyces) 属

サッカロミコシス (Saccharomycopsis) 属

サッカロミコデス (Saccharomycodes) 属

シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 属

ヴィッカーハミア (Wickerhamia) 属

デバリオミセス (Debaryomyces) 属

ハンゼヌラ (Hansenula) 属

ハンゼニアスポーラ (Hanseniaspora) 属

リボミセス (Lypomyces) 属

ピキア (Pichia) 属

クロッケラ (Kloeckera) 属

キャンジダ(Candida) 属  
ザイゴサッカロミセス(Zygosaccharomyces) 属  
オガタエア(Ogataea) 属  
クライシア(Kuraishia) 属  
コマガタエラ (Komagataella) 属  
ヤロウヴィア (Yarrowia) 属  
ウィリオプシス (Williopsis) 属  
ナカザワエア (Nakazawaea )属  
クリベロマイセス (Kluyveromyces)属  
トルラスポーラ (Torulaspora)属  
シテロマイセス(Citeromyces) 属  
ウォルトマイセス(Waltomyces)属  
バチルス (Bacillus) 属  
スタフィロコッカス(Staphylococcus)属  
シュードモナス(Pseudomonas) 属  
マイクロコッカス (Micrococcus)属  
エキシグオバクテリウム (Exiguobacterium) 属  
ムコール (Mucor)属

【 0 0 0 7 】

本発明はまた、以下のいずれかの属に属するネロリドール生産菌を培地に培養し、ネロリドールを菌体内外に生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、ネロリドールの製造方法である。

サッカロミセス (Saccharomyces)属  
クリプトコッカス(Cryptococcus)属  
カンジダ(Candida) 属  
ストレプトマイセス(Streptomyces)属  
ノカルディア (Nocardia) 属

以下に本発明を詳細に説明する。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】

本発明では微生物を用いる発酵法によってゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物を製造する。本発明にいう、ゲラニルゲラニオールの類縁化合物とは、ゲラニルゲラニルピロリン酸、及びこれらの合成に関連し生成するゲラニルゲラニルモノリン酸、ファルネシルピロリン酸、ファルネシルモノリン酸、ファルネソール、ゲラニルピロリン酸、ゲラニルモノリン酸、ゲラニオール、ネロリドール、ゲラニルリナロール、リナロールなどをいう。

【0009】

本発明においてゲラニルゲラニオールの生産に使用する微生物は、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、サッカロミコシス (*Saccharomycopsis*) 属、サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヴィッカーハミア (*Wickerhamia*) 属、デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、クロッケラ (*Kloeckera*) 属、キャンジダ (*Candida*) 属、ザイゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、クライシア (*Kuraishia*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、ヤロウヴィア (*Yarrowia*) 属、ウィリオプシス (*Williopsis*) 属、ナカザワエア (*Nakazawaea*) 属、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、又はトルラスポーラ (*Torulaspora*) 属のいずれかの属に属する酵母、あるいはムコール (*Mucor*) 属に属する糸状菌であって、ゲラニルゲラニオールを生産する能力のある菌株であればよい。

【0010】

ゲラニルゲラニオール生産菌を以下に具体的に列挙する。

(1) サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属；

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 12341, IFO 0565, IFO 0222, IFO 0216, ATCC 9080, IFO 1346, ATCC 204660, IFO 0538, IFO 0210、*Saccharomyces ellipsoideus* 京都大学保存株4102、*Saccharomyces sake* 協会2号、*Saccharomyces rosei* IFO 0252、*Saccharomyces kluyveri* IFO 1892

(2) サッカロミコシス (*Saccharomycopsis*) 属；

*Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0106, IFO 1665, IFO 1774, IFO 0107

(3) サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属 ;

*Saccharomycodes ludwigii* IFO 0339

(4) シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属 ;

*Schizosaccharomyces octosporus* IAM 4842, *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0346

(5) ヴィッカーハミア (*Wickerhamia*) 属 ;

*Wickerhamia fluorescens* IFO 1116

(6) デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属 ;

*Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* IFO 0794 、 *Debaryomyces castellii* IFO 1359 、 *Debaryomyces vanriijiae* var. *vanriijiae* JCM 2169

(7) ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属 ;

*Hansenula polymorpha* 京都大学保存株4327

(8) ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属 ;

*Hanseniaspora valbyensis* IFO 0115

(9) ピキア (*Pichia*) 属 ;

*Pichia membranaefaciens* IFO 0128、 *Pichia aganobii* 京都大学保存株4261、  
*Pichia naganishii* IFO 1670 、 *Pichia silvicola* IFO 0807 、 *Pichia anomala*  
IFO 0118, IFO 0569, IFO 0707

(10) クロッケラ (*Kloeckera*) 属 ;

*Kloeckera japonica* IFO 0151

(11) キャンジダ (*Candida*) 属 ;

*Candida krusei* IFO 0013、 *Candida kefyr* IFO 0706、 *Candida tenuis* IFO 071  
6 、 *Candida solani* IFO 0762 、 *Candida glabrata* IFO 0005, IFO 0622 、 *Cand*  
*ida albicans* IFO 1060 、 *Candida zeylanoides* IFO 0719、 *Candida catenulata*  
IFO 0720 、 *Candida cariosilignicola* IFO 1910 、 *Candida stellata* IFO 070

1

(12) ザイゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 属 ;

*Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0487、 *Zygosaccharomyces japonicus* IFO 0595

(13) オガタエア (Ogataea) 属 ;

*Ogataea glucozyma* IF0 1472 、 *Ogataea polymorpha* IF0 1475

(14) クライシア (Kuraishia) 属 ;

*Kuraishia capsulata* IF0 0974

(15) コマガタエラ (Komagataella) 属 ;

*Komagataella pastoris* IF0 0948

(16) ヤロウヴィア (Yarrowia) 属 ;

*Yarrowia lipolytica* IF0 0717

(17) ウィリオプシス (Williopsis) 属 ;

*Williopsis saturnus* var. *saturnus* IF0 0125, IF0 0941

(18) ナカザワエア (Nakazawaea) 属 ;

*Nakazawaea holstii* IF0 0980

(19) クリベロマイセス (Kluyveromyces) 属 ;

*Kluyveromyces marxianus* IF0 0617, IF0 0288, *Kluyveromyces thermotolerans* IF0 0662 、 *Kluyveromyces lactis* IF0 0648

(20) トルラスポーラ (Torulaspora) 属 ;

*Torulaspora delbrueckii* IF0 0422

(21) クリプトコッカス (Cryptococcus) 属 ;

*Cryptococcus humicolus* IF0 1527

(22) ムコール (Mucor) 属

*Mucor javanicus* IF0 4570

【 0 0 1 1 】

本発明において、ファルネソール生産に使用することのできる微生物としては、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヴィッカーハミア (*Wickerhamia*) 属、デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属、ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属、リポミセス (*Lipomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、クライシア (*Kuraishia*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、ヤロウヴィア (*Yarrowia*) 属、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属

、トルラスポーラ (*Torulaspora*) 属、ザイゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 属、ウィリオプシス (*Williopsis*) 属、シテロマイセス (*Citeromyces*) 属、ウォルトマイセス (*Waltomyces*) 属、又はクリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属のいずれかの属に属する酵母、あるいはバチルス (*Bacillus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、エキシグオバクテリウム (*Exiguobacterium*) 属のいずれかの属に属する細菌、あるいはムコール (*Mucor*) 属に属する糸状菌であって、ファルネソールを生産する能力のある菌株であればよい。

【 0 0 1 2 】

ファルネソール生産菌を以下に具体的に列挙する。

(1) サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属 ;

*Saccharomyces cerevisiae* IF0 1346, ATCC 204660, IF0 0262, IF0 0538, IF0 0565, IF0 0210、*Saccharomyces unisporus* IF0 0215、*Saccharomyces sake* 協会 2 号、*Saccharomyces ellipsoideus* 京都大学保存株 4102、*Saccharomyces rosei* IF0 0252、*Saccharomyces logos* 京都大学保存株 4101、*Saccharomyces dairensis* IF0 0285、*Saccharomyces bayanus* IF0 0539, IF0 0613、*Saccharomyces kluyveri* IF0 1892、*Saccharomyces paradoxus* IF0 0259

(2) サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属 ;

*Saccharomycodes ludwigii* IF0 0339

(3) シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属 ;

*Schizosaccharomyces pombe* IF0 0346, IF0 0358、*Schizosaccharomyces octosporus* IAM 4842

(4) ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属 ;

*Hanseniaspora valbyensis* IF0 0115

(5) デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属 ;

*Debaryomyces hansenii* IF0 0023、*Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* IF0 0749、*Debaryomyces castellii* IF0 1359、*Debaryomyces vanriijiae* var. *vanriijiae* JCM 2169

(6) リポミセス (*Lypomyces*) 属 ;

*Lypomyces starkeyi* IFO 0678

(7) ピキア(*Pichia*)属 ;

*Pichia aganobii* 京都大学保存株 4261、*Pichia naganishii* IFO 1670、*Pichia anomala* IFO 0118, IFO 0569, IFO 0963, IFO 707

(8) カンジダ(*Candida*) 属 ;

*Candida utilis* IFO 0626、*Candida albicans* IFO 0579、*Candida zeylanoide*s IFO 0719、*Candida glabrata* IFO 0005, IFO 0622、*Candida cariosilignicola* IFO 1910、*Candida stellata* IFO 0701、*Candida solani* IFO 0762

(9) ヴィッカーハミア(*Wickerhamia*) 属 ;

*Wickerhamia fluoresces* IFO 1116

(10) クライシア(*Kuraishia*) 属 ;

*Kuraishia capsulata* IFO 0974

(11) コマガタエラ (*Komagataella*) 属 ;

*Komagataella pastoris* IFO 0948

(12) オガタエア(*Ogataea*) 属 ;

*Ogataea glucozyma* IFO 1472、*Ogataea polymorpha* IFO 1475

(13) ヤロウヴィア (*Yarrowia*) 属 ;

*Yarrowia lipolytica* IFO 0717

(14) クリベロマイセス (*Kluyveromyces*)属 ;

*Kluyveromyces marxianus* IFO 0288、*Kluyveromyces thermotolerans* IFO 0662、*Kluyveromyces lactis* IFO 0648

(15) トルラスポーラ (*Torulaspora*)属 ;

*Torulaspora delbrueckii* IFO 0422

(16) ザイゴサッカロミセス(*Zygosaccharomyces*) 属 ;

*Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0487, IFO 0686、*Zygosaccharomyces japonicus* IFO 0595、*Zygosaccharomyces fermentati* IFO 0021

(17) ウィリオブシス (*Williopsis*) 属 ;

*Williopsis saturnus* var. *saturnus* IFO 0941

(18) シテロマイセス(*Citeromyces*) 属

*Citeromyces matritensis* IF0 0954

(19) ウォルトマイセス(*Waltomyces*)属

*Waltomyces lipoder* IF0 0673

(20) クリプトコッカス(*Cryptococcus*) 属 ;

*Cryptococcus humicolus* IF0 1527

(21) バチルス (*Bacillus*) 属 ;

*Bacillus amyloliquefaciens* IF0 3022、*Bacillus pumilus* IF0 3030

(22) スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)属 ;

*Staphylococcus epidermidis* IF0 3762

(23) シュードモナス(*Pseudomonas*) 属 ;

*Pseudomonas* sp. 京都大学保存株 876

(24) マイクロコッカス (*Micrococcus*)属 ;

*Micrococcus luteus* IF0 3067

(25) エキシグオバクテリウム (*Exiguobacterium*)属 ;

*Exiguobacterium acetylicum* IF0 12146

(26) ムコール (*Mucor*)属

*Mucor javanicus* IF0 4570

【 0 0 1 3 】

本発明においてネロリドールの生産に使用する微生物は、サッカロミセス (*Saccharomyces*)属、カンジダ(*Candida*) 属又はクリプトコッカス(*Cryptococcus*)に属する酵母、あるいはストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属又はノカルディア (*Nocardia*) 属に属する放線菌であって、ネロリドールを生産する能力のある菌株であればよい。

【 0 0 1 4 】

ネロリドール生産菌を以下に具体的に列挙する。

(1) ノカルディア (*Nocardia*) 属 ;

*Norcadia asteroides* IF0 3384 、*Norcadia fusca* IF0 14340

(2) ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属 ;

*Streptomyces gardneri* IF0 12865



(3) サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属 ;

*Saccharomyces unisporus* IF0 0215 、 *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0210 、  
*Saccharomyces ellipsoideus* 京都大学保存株 4102

(4) カンジダ (*Candida*) 属 ;

*Candida glabrata* IF0 0005、 *Candida solani* IF0 0762

(5) クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属

*Cryptococcus humicolus* IF0 1527.

【 0 0 1 5 】

次に本発明で用いる微生物の培養について説明する。微生物を培養する培地としては通常、これらの微生物が生育し得る培地であれば良く、具体的には、酵母菌（子囊菌酵母類、不完全菌酵母類）の場合、YM培地、KY培地、F101培地等が、細菌・放線菌の場合、KB培地等が例示される。

【 0 0 1 6 】

炭素源としては菌体が資化し生育できる炭素化合物であればいずれでも使用可能である。

窒素源としては、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム等の無機窒素源、酵母エキス、ペプトン、肉エキスなどの有機窒素源を使用することができる。これらの他に、必要に応じて、無機塩類、金属塩、ビタミンなどを添加することもできる。

【 0 0 1 7 】

培養は、微生物の種類によって異なるが、通常は、温度20～40℃、より好ましくは25～35℃でpH5～9で行うことが好ましい。また、微生物の種類に応じて嫌気下でも好気下でもいずれも行うことができるが、増殖速度が速いことから好気下での振盪培養や回転培養が好ましい。

但し、培養条件は、用いる微生物や培地組成などに応じてゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物の生産量が最大になるように設定することが重要であることは当然である。

【 0 0 1 8 】

また、ゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物（以下、ゲラニルゲラニオー

ル類という)の生産量を増大させたり、生成物質の菌体外への分泌を促進させるには、培地に糖類及び／又は油脂類を添加するとよい。

糖類としては、例えばグルコース、シュクロースを用いることができ、油脂類としては、例えば大豆油、魚油、アーモンド油、オリーブ油等を用いることができる。

【 0 0 1 9 】

糖類の添加量は培地に対して例えば1%～10%、好ましくは2%～7%であり、油脂類の添加量は培地に対して例えば0.01%以上、好ましくは1%以上とすればよい。

さらに、ゲラニルゲラニオール類の生産量上げるためには、培地中にエルゴステロールとともにスクアレン合成酵素阻害剤を添加すればよい。スクアレン合成酵素阻害剤としては、BSM-187745(Toxicology and applied pharmacology 14 5, 91-98 (1987))、SQAD、ゼラゴシック酸などが挙げられ、1～20mg/L で用いればよい。

【 0 0 2 0 】

本発明においてゲラニルゲラニオール類を生産する工程はバッチ式でも、また、バイオリアクターを用いた連続式でも可能である。微生物菌体はそのままゲラニルゲラニオール類の生産に供してもよいし、破碎菌体、菌体培養液、粗酵素、精製酵素等の菌体処理物としてもよい。また、培養菌体又は該菌体処理物は、固定化法で固定化してもよい。かかる菌体又は菌体処理物を培養することによって、ゲラニルゲラニオール類を菌体中又は培養上清中に生成蓄積せしめ、これを採取する。

【 0 0 2 1 】

培養上清画分からゲラニルゲラニオール類を採取するには、遠心分離にて菌体を除去した後、得られた上清に塩化マグネシウムを含む緩衝液とアルカリフォスファターゼを加えて処理した後、ペンタン、メタノール等の溶剤にて抽出する。

また、培養菌体画分からゲラニルゲラニオール類を採取するには、遠心分離にて集菌した菌体を破碎し、これに塩化マグネシウムを含む緩衝液とアルカリフォスファターゼを加えて処理した後、ペンタン、メタノール等の溶剤にて抽出する

また、上記の溶剤抽出法に、クロマトグラフィー等公知の精製方法を適宜併用することもできる。

#### 【 0 0 2 2 】

抽出の際、アルカリフォスファターゼを使用すると、菌体または培養液中にファルネソール、ゲラニルゲラニオールの前駆体として存在するファルネシルピロリン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸を加水分解させ、ファルネソール及びゲラニルゲラニオールの生産量を挙げるのに有効である。フォスファターゼは大腸菌由来のアルカルフォスファターゼが好ましいが、その他、ポテト酸性フォスファターゼ、子牛腸壁フォスファターゼなどを用いてもよい。また、ほとんどの微生物は、内在性フォスファターゼを有することから、若干の生産量は低下するが、フォスファターゼ処理をすることなく、有機溶媒抽出してもよい。

#### 【 0 0 2 3 】

なお、本発明の製造方法においてはゲラニルゲラニオール類の検出及び定量は、市販のガスクロマトグラフィーにより行い、内部標準の 1-ウンデカノールに対するピーク面積比により定量する。

#### 【 0 0 2 4 】

##### 【実施例】

以下に代表的な実施例を示し本発明の具体的な説明を行うが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

##### 【実施例 1】（ゲラニルゲラニオール類生産菌のスクリーニング）

##### (1) 菌株

ATCC、IAM、IFO、JCMより購入した菌株及び京都大学清水研究室より入手した菌株約 930 株についてゲラニルゲラニオール類生産菌をスクリーニングした。

#### 【 0 0 2 5 】

##### (2) 菌株保存

菌株保存は以下の 3 通りを適宜行なった。

##### ① グリセロールストック

液体培養液900  $\mu$ lにオートクレーブ滅菌した50%グリセロール（ナカライ製）300  $\mu$ l を加え、 $-80^{\circ}\text{C}$ と $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存菌体は一週間後にプレートに蒔き保存できていることを確認した。

## ② 凍結乾燥

液体培養液2mlを2mlエッペンドルフチューブに入れて遠心し（6000rpm、5分）、菌体を集めた。 $110^{\circ}\text{C}$ 、20分オートクレーブ滅菌した20%スキムミルク（森永乳業製）溶液150  $\mu$ l を加えて菌体を懸濁させた。乾熱滅菌したパスツールピペットを用いて懸濁液を凍結乾燥用ガラス管に入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷凍庫で凍結させた。凍結乾燥機（Labconco製Lymph Lock 1L）で一晩十分に乾燥させてからハンドバーナー（Prince製GB20001）で封印した。Tesler coil（若井田理学製WTC-100型）を用い封印が確実であるかどうか確かめた。

## ③ パラフィン重層

液体培養液と同じ培地組成の2%アガースラントを作製した。液体培養液よりデイスポループを用いて菌をストリークした。室温に一週間おいて十分に菌が生えたことを確認してからオートクレーブ滅菌にした流動パラフィン（ナカライ製）を深さ1cm程度になるよう加え $4^{\circ}\text{C}$ にて保存した

【0026】

## (3) 液体培地の調製

酵母菌培養にはYM培地（Difco 製）、あるいは以下のようにして調製したKY培地、F101培地を用いた。細菌・放線菌については、KB培地を用いた。

プレートは同培地に終濃度2%のバクトアガー（Difco製）を加え作製した。

### KY培地

以下を1Lの脱イオン水に加え、2N水酸化ナトリウム溶液でpH5.5に調整した後、脱イオン水で1Lにし、オートクレーブした。

Malt Extract (Difco製) 5g

Yeast Extract (Difco製) 5g

### F101培地

角切りしたジャガイモ200gを500mlの脱イオン水に入れ、30分間沸騰後、ガーゼで不溶化物を除去した。以下を加え、脱イオン水で1Lにし、オートクレーブ

した。

Yeast Extract (Difco製)	30g
グルコース (ナカライ製)	15g
シュクロース (ナカライ製)	15g

#### K B 培地

以下を 1 L の脱イオン水に加え、2 N 水酸化カリウム溶液で pH7.0 に調整した後、脱イオン水で 1 L にし、オートクレーブした。

Bactotryptone (Difco製)	5g
Yeast Extract (Difco製)	5g
グルコース (ナカライ製)	1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ナカライ製)	0.7g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ナカライ製)	0.3g

【0 0 2 7】

#### (4) 液体培養

上記培地をそれぞれ用い、バッフル付き 100ml 容三角フラスコに培地 20ml を入れ、モルトン栓をし、121 °C、1.2 気圧にて 15 分間オートクレーブ滅菌を行った。これにスラントより一白金耳植菌し、30°C、130rpm で 3 日間回転培養した。

【0 0 2 8】

#### (5) 上清画分からのゲラニルゲラニオール類の抽出

培養液 2.5ml を 18 φ mm × 125mm 試験管に入れ、ベックマン製遠心分離器 GP centrifuge で 1000rpm、5 分遠心し、上清を新しい 18 φ mm × 125mm 試験管に移した。6mM の塩化マグネシウムを含むトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 0.5ml、大腸菌アルカリフォスファターゼ (宝酒造製) 5 μl (2 ユニット) を加え、65°C で 30 分加熱した。氷上で十分に冷却してからペンタン 2ml、メタノール 1ml を加え、十分に混合後、ベックマン製遠心分離器 GP centrifuge で 1000rpm、5 分遠心し、上清を別の新しい試験管に移した。ドラフト内でペンタン・メタノール溶媒を蒸発させた後、300ml のペンタンに再溶解し、GC/MS 用バイアル瓶に詰めた。

【0 0 2 9】

#### (6) 菌体画分からのゲラニルゲラニオール類の抽出

① 細菌・放線菌の場合

液体培養液10mlを50mlコーニングチューブに入れ、ベックマン製冷却遠心機 (Avant J25-I)で6000rpm、5分遠心分離し菌体を集めた。菌体を脱イオン水0.5mlに懸濁させた後、10mlスピッツ管に移し、東海電機製超音波細胞破碎機UC W-201で破碎した(条件: 10℃、1分破碎-30秒停止を20分間繰り返す)。18φmm×125mm試験管に移し、6mMの塩化マグネシウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5mlを加え、(5)と同様にしてフォスファターゼ処理、抽出を行なった。

② 酵母の場合

液体培養液2.5mlを18φmm×125mm試験管に入れ、ベックマン製遠心分離器GP cetrifugeで1000rpm、5分間遠心し、菌体を集めた。6mMの塩化マグネシウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5mlを加え、菌体を懸濁させた後、破碎用ガラスチューブに移した。等量のガラスビーズ(シグマ製 acid washed 425φ-600μm)を加え、安井機械製Multi-Beads Synchronizer MB-200で破碎した(条件: 室温、2500rpm, 20分)。18φmm×125mm試験管に全量移し、(5)と同様にフォスファターゼ処理、抽出を行った。

【 0 0 3 0 】

(7) ゲラニルゲラニオール類の分析

ヒューレットパッカード製HP6890/5973 GC/MSシステムを用い以下の条件で分析した。

①インレット温度: 250℃

②ディテクター温度: 260℃

③MSゾーン温度

MS Quad: 150℃

MS Source: 230℃

④スキャンパラメーター

Low Mass: 35

High Mass: 200

Threshold: 40

⑤インジェクションパラメーター

モード：自動インジェクション

サンプル量：2  $\mu$ l

洗浄回数：メタノールで3回、ヘキサンで2回

スプリット比：1：20

カラム：ヒューレットパッカード製HP-5MS

(0.25mm $\times$ 30M、フィルム厚0.25  $\mu$ m)

キャリアーガス：ヘリウム1.0ml/min

ソルベントディレイ：2 min

オープン昇温条件：115 $^{\circ}$ C、1.5分保持

70/分で250 $^{\circ}$ Cまで昇温、2分保持

70/分で300 $^{\circ}$ Cまで昇温、7分保持

ポストタイム 0

内部標準：1-ウンデカノール/エタノール溶液 (1  $\mu$ l/ml) を各バイアルに  
10  $\mu$ l 添加

注入口ライナー：スプリット/スプリットレスライナー

解析：TIC を取り込んだ後、69マスを選択し、1-ウンデカノール (RT=3.39min)、ネロリドール (RT=3.86min)、ファルネソール (RT=4.23min)、  
ゲラニルゲラニオール (RT=5.78min) のピーク面積を積分した。内部標準のウン  
デカノールに対するピーク面積比より定量した。

【0031】

#### (8) 結果

供試菌中、子囊菌酵母類162株のうちの約1/3、不完全菌酵母類73株の  
うちの約一割に ゲラニルゲラニオール及び/又はファルネソール生産菌を、ま  
た放線菌95株のうち3株にネ ロリドール生産菌を確認できた。

表1にゲラニオールのみを生産する菌株、表2にゲラニオールとファルネソール  
を生産する菌株、表3にファルネソールのみを生産する菌株、表4にネロリド  
ールのみを生産する菌株をその生産量とともにそれぞれ示す。

【0032】

【表 1】

菌株 No.	菌 株 属 種	培養上清画分 ( $\mu$ g/L 培養液)		菌体画分	
		FOH	GGOH	FOH	GGOH
ATCC 12341	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0	0.0	0.0	14.4
K 4010	<i>Saccharomyces</i> sp.	0.0	0.0	0.0	9.1
K 4031	<i>Saccharomyces</i> sp.	0.0	0.0	0.0	7.0
K 4037	<i>Saccharomyces</i> sp.	0.0	0.0	0.0	5.8
K 4039	<i>Saccharomyces</i> sp.	0.0	0.0	0.0	5.5
K 4041	<i>Saccharomyces</i> sp.	0.0	0.0	0.0	8.4
IFO 0565	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0	0.0	0.0	54.7
IFO 0222	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0	0.0	0.0	3.3
IFO 0216	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0	0.0	0.0	5.8
ATCC 9080	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0	0.0	0.0	5.7
IFO 0106	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	0.0	0.0	0.0	3.4
IFO 0125	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturuns</i>	0.0	0.0	0.0	5.4
IFO 0807	<i>Pichia silvicola</i>	0.0	0.0	0.0	1.2
IFO 0980	<i>Nakazawaea holstii</i>	0.0	0.0	0.0	5.2
K 4327	<i>Hansenula polymopla</i>	0.0	0.0	0.0	4.7
IFO 0151	<i>Kloeckera japonica</i>	0.0	0.0	0.0	10.2
IFO 0128	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.0	0.0	0.0	11.0
K 4261	<i>Pichia aganobii</i>	0.0	4.0	0.0	0.0
IFO 0941	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturuns</i>	0.0	0.0	0.0	6.7
IFO 0013	<i>Candida krusei</i>	0.0	0.0	0.0	16.5
IFO 0706	<i>Candida kefyr</i>	0.0	0.0	0.0	4.9
IFO 0716	<i>Candida tenuis</i>	0.0	0.0	0.0	8.7
IFO 0617	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.0	0.0	0.0	25.2
IFO 0762	<i>Candida solani</i>	0.0	0.0	0.0	29.0
IFO 1060	<i>Candida albicans</i>	0.0	2.4	0.0	0.0
IFO 0720	<i>Candida catenulata</i>	0.0	0.0	0.0	25.9

K : 京都大学保存株

FOH : ファルネソール

GGOH: ゲラニルゲラニオール

【0033】



【表 2】

菌 株			培養上清画分		菌体画分	
			(μ g / L 培養液)			
菌株 No.	属	種	FOH	GGOH	FOH	GGOH
K 4002	Saccharomyces	sp.	4.4	0.0	0.0	10.9
K 4006	Saccharomyces	sp.	4.2	0.0	4.3	6.7
K 4013	Saccharomyces	sake	0.0	0.0	7.3	5.0
K 4015	Saccharomyces	sake	7.9	0.0	6.6	7.9
K 4016	Saccharomyces	sake	4.5	0.0	2.2	6.5
K 4017	Saccharomyces	sake	4.3	0.0	7.9	7.9
K 4018	Saccharomyces	sake	4.4	0.0	5.0	9.9
K 4020	Saccharomyces	sake	0.0	0.0	2.8	5.4
K 4022	Saccharomyces	sake	0.0	0.0	2.1	4.7
K 4023	Saccharomyces	sake	0.0	0.0	5.2	11.5
K 4025	Saccharomyces	sake	5.0	0.0	5.5	2.0
K 4026	Saccharomyces	sake	0.0	0.0	2.6	7.6
K 4029	Saccharomyces	sake	0.0	0.0	2.2	2.3
K 4030	Saccharomyces	sp.	5.1	0.0	4.6	3.7
K 4036	Saccharomyces	sp.	0.0	0.0	4.1	15.2
K 4045	Saccharomyces	cerevisiae	0.0	0.0	44.9	18.6
K 4102	Saccharomyces	ellipsoideus	0.0	0.0	22.9	7.2
K 4103	Saccharomyces	cerevisiae	0.0	0.0	22.6	8.6
K 4104	Saccharomyces	cerevisiae	0.0	0.0	15.8	31.7
IFO 0252	Saccharomyces	rosei	0.0	0.0	28.5	39.0
IFO 0288	Kluyveromyces	marxianus	0.0	0.0	11.3	22.6
協会 2 号	Saccharomyces	sake	0.0	0.0	9.7	26.1
IFO 0422	Torulaspora	delbrueckii	0.0	0.0	8.2	11.9
IFO 0487	Zygosaccharomyces	rouxii	0.0	0.0	4.9	14.3
IFO 1346	Saccharomyces	cerevisiae	0.0	0.0	4.3	13.1
ATCC 204660	Saccharomyces	cerevisiae	8.7	0.0	9.3	26.8
IFO 0339	Saccharomycodes	ludwigii	15.3	0.0	6.0	80.9
IAM 4842	Schizosaccharomyces	octosporus	2.7	0.0	2.2	12.1
IFO 1116	Wickerhamia	fluorescens	18.7	0.0	4.2	23.0
IFO 0794	Debaryomyces	hansenii	4.8	2.7	7.7	11.5
	var. fabryi					
IFO 1359	Debaryomyces	castellii	18.5	0.0	6.3	21.1

## 【 0 0 3 4 】

(表 2 続 き)

JCM 2169	Debaryomyces vanriijiae	73.7	0.0	14.3	6.2
	var vanriijiae				
IFO 0115	Hanseniaspora valbyensis	13.6	0.0	7.4	103.5
IFO 0118	Pichia anomala	0.0	0.0	2.2	15.3
IFO 0569	Pichia anomala	0.0	0.0	7.3	28.2
IFO 0941	Williopsis saturnus	4.7	0.0	69.8	78.7
	var. saturnus				
IFO 1475	Ogataea polymorpha	0.0	0.0	13.5	36.1
IFO 1670	Pichia naganishii	1.2	2.1	0.0	0.0
IFO 0707	Pichia anomala	8.6	0.6	0.0	12.3
IFO 0719	Candida zeylanoides	10.2	0.0	4.4	20.3
IFO 0701	Candida stellata	10.3	0.0	0.0	4.9
IFO 0662	Kluyveromyces thermotolerans	13.7	0.0	10.4	9.2
IFO 0648	Kluyveromyces lactis	16.0	0.0	6.3	72.9
IFO 0005	Candida glabrata	35.7	5.4	4.5	28.3
IFO 0595	Zygosaccharomyces japonicus	9.3	3.6	0.0	0.0

K : 京都大学保存株

FOH : ファルネソール

GGOH : ゲラニルゲラニオール

## 【 0 0 3 5 】

【表 3】

菌 株		培養上清画分		菌体画分	
		(μ g / L 培養液)			
菌株 No.	属 種	FOH	GGOH	FOH	GGOH
K 4003	Saccharomyces sp.	5.0	0.0	19.3	0.0
K 4004	Saccharomyces sp.	10.6	0.0	15.2	0.0
K 4011	Saccharomyces sake	0.0	0.0	9.0	0.0
K 4021	Saccharomyces sake	0.0	0.0	2.2	0.0
K 4101	Saccharomyces logos	0.0	0.0	18.4	0.0
IFO 0686	Zygosaccharomyces rouxii	0.0	0.0	10.1	0.0
IFO 0285	Saccharomyces dairensis	4.4	0.0	0.0	0.0
IFO 0262	Saccharomyces cerevisiae	7.1	0.0	0.0	0.0
IFO 0021	Zygosaccharomyces fermentati	5.4	0.0	0.0	0.0
IFO 0259	Saccharomyces paradoxus	3.2	0.0	0.0	0.0
IFO 0539	Saccharomyces bayanus	1.4	0.0	0.0	0.0
IFO 0613	Saccharomyces bayanus	2.3	0.0	0.0	0.0
IFO 0346	Schizosaccharomyces pombe	4.4	0.0	16.8	0.0
IFO 0358	Schizosaccharomyces pombe	2.3	0.0	4.7	0.0
IFO 0023	Debaryomyces hansenii	12.2	0.0	0.0	0.0
IFO 0954	Citeromyces matritensis	8.5	0.0	0.0	0.0
IFO 0974	Kuraishia capsulata	0.0	0.0	8.2	0.0
IFO 0963	Pichia anomala	0.0	0.0	9.6	0.0
IFO 0673	Waltomyces lipofer	10.1	0.0	0.0	0.0
IFO 0678	Lypomyces starkeyi	4.8	0.0	0.0	0.0
IFO 0579	Candida albicans	12.8	0.0	0.0	0.0
IFO 0626	Candida utilis	3.0	0.0	0.0	0.0
IFO 3022	Bacillus amyloliquefaciens	4.1	0.0	0.0	0.0
IFO 3030	Bacillus pumilus	6.0	0.0	0.0	0.0
IFO 3762	Staphylococcus epidermidis	6.1	0.0	0.0	0.0
K 876	Pseudomonas sp.	18.6	0.0	0.0	0.0

K : 京都大学保存株

FOH : ファルネソール

GGOH : ゲラニルゲラニオール

【 0 0 3 6 】

【表 4】

菌株 No.	属	種	培養上清画分			菌体画分		
			(μg/L 培養液)					
			NE	FOH	GOH	NE	FOH	GOH
IFO 12865	<i>Streptomyces</i>	<i>gardneri</i>	0.0	0.0	0.0	11.5	0.0	0.0
IFO 3384	<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i>	0.0	0.0	0.0	14.2	0.0	0.0
IFO 14340	<i>Nocardia</i>	<i>fusca</i>	0.0	0.0	0.0	6.4	0.0	0.0

NE : ネロリドール

FOH : ファルネソール

GOH: ゲラニルゲラニオール

## 【0037】

## 〔実施例 2〕（培養条件の検討）

実施例 1 において、ゲラニオゲラニオール生産が多かった上位 2 株 *Hanseniaspora valbyensis* IFO 0115 株、*Saccharomyces ludwigii* IFO 0339 株、及びゲラニルゲラニオールとファルネソールの生産量が共に多かった *Candida glabrata* IFO 0005 株について、培養日数、培地組成、ファスファターゼ処理の有無による生産量の変化を表 5（培養上清画分）、表 6（菌体画分）に示す。いずれの株もファルネソール、ゲラニオゲラニオールの生産は培養時間とともに増加し、培地に 5% グルコースを添加すると菌体画分中の生産量が増加する。さらに、1% 大豆油を添加した場合、*Candida glabrata* では分泌が促進される。このように、微生物種によって差はあるものの、5% グルコースと 1% 大豆油を含む培地を用いることによりファルネソールとゲラニルゲラニオールの生産量、分泌量を増やすことが可能である。

## 【0038】

また、フォスファターゼ処理の有無で比較すると、上清画分ではフォスファターゼ処理しない方が検出量が多く、菌体画分では逆にフォスファターゼ処理すると検出量が多くなる傾向にあることから、ファルネシルピロリン酸、ゲラニルピロリン酸が菌体画分に存在していると考えられる。

## 【0039】

【表 5】

培養上清画分 ( $\mu\text{g/L}$ 培養液)						
			ホスファターゼ 処理なし		ホスファターゼ 処理有り	
菌株 No.	培地組成	培養日数 (日)	FOH	GGOH	FOH	GGOH
IFO 0005	YM	1	0.0	0.0	1.5	0.0
		2	0.0	0.0	0.0	0.0
		3	0.0	0.0	0.0	0.0
	YM+Glc	1	0.0	0.0	6.1	0.0
		2	0.0	0.0	9.5	0.0
		3	29.4	2.3	13.9	0.0
	YM+Glc+SBO	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	135.6	92.0	69.9	31.5
		3	850.7	416.5	116.6	40.0
IFO 0115	YM	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	0.0	0.0	0.0	0.0
		3	34.0	0.0	0.0	0.0
	YM+Glc	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	11.3	0.0	0.0	0.0
		3	36.4	0.0	18.0	0.0
	YM+Glc+SBO	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	24.0	0.0	5.1	0.0
		3	30.3	26.5	7.9	0.0
IFO 0339	YM	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	8.7	0.0	0.0	0.0
		3	0.0	0.0	0.0	0.0
	YM+Glc	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	16.8	0.0	17.7	0.0
		3	67.1	0.0	20.8	0.0
	YM+Glc+SBO	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	11.7	5.3	0.0	0.0
		3	85.6	7.3	6.5	0.0

FOH: ファルネソール      GGOH: ゲラニルゲラニオール

YM : YM培地 (Difco 製)

YM +Glc : YM培地 (Difco 製) +5%グルコース

YM +Glc +SBO : YM培地 (Difco 製) +5%グルコース+1%大豆油

【0040】

【表 6】

菌体画分 (μg/L 培養液)						
ホスファターゼ 処理なし      ホスファターゼ 処理有り						
培地組成		培養日数				
菌株 No.		(日)	FOH	GGOH	FOH	GGOH
IFO 0005	YM	1	39.4	0.0	0.0	0.0
		2	14.8	37.3	0.0	0.0
		3	11.4	41.7	51.2	0.0
	YM+Glc	1	8.4	0.0	0.0	0.0
		2	44.1	134.4	86.8	304.8
		3	104.4	323.9	202.4	772.6
	YM+Glc+SBO	1	5.8	0.0	0.0	0.0
		2	427.4	178.9	248.0	239.6
		3	835.3	363.7	1321.6	1176.2
IFO 0115	YM	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	34.0	5.1	0.0	0.0
		3	21.1	45.6	0.0	63.7
	YM+Glc	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	46.6	26.1	23.9	0.0
		3	54.2	108.5	78.0	491.8
	YM+Glc+SBO	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	0.0	0.0	9.7	0.0
		3	61.3	122.0	69.2	286.1
IFO 0339	YM	1	18.0	0.0	0.0	0.0
		2	16.6	0.0	0.0	0.0
		3	19.5	48.3	0.0	71.0
	YM+Glc	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	58.6	34.1	12.0	0.0
		3	62.3	173.8	67.8	464.8
	YM+Glc+SBO	1	0.0	0.0	0.0	0.0
		2	96.4	10.3	9.3	0.0
		3	61.6	103.7	27.9	135.6

FOH: ファルネソール      GGOH: ゲラニルゲラニオール

YM : YM培地 (Difco 製)

YM +Glc : YM培地 (Difco 製) +5%グルコース

YM +Glc +SBO : YM培地 (Difco 製) +5%グルコース+1%大豆油

【0041】

【実施例 3】 (培養条件の検討)

実施例 1 において試験した菌株のうちの数種について、YM培地にて培養した場合と、YM培地に 5 % グルコースと 1 % 大豆油を添加した培地で培養した場合の生産量をそれぞれ表 7、表 8 に示す。5 % グルコースと 1 % 大豆油を添加した培地では、生産量が大幅に上昇した。

【0 0 4 2】

【表 7】

培地組成：YM培地 (Difco 製)

菌株 No.	菌 株 属 種	培養上清画分 ( $\mu$ g / L 培養液)		菌体画分	
		FOH	GGOH	FOH	GGOH
K 4104	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0	0.0	15.8	31.7
IFO 0252	<i>Saccharomyces rosei</i>	0.0	0.0	28.5	39.0
IFO 0565	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0	0.0	0.0	54.7
IFO 0941	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	4.7	0.0	69.8	78.7
IFO 1475	<i>Ogataea polymorpha</i>	0.0	0.0	13.5	36.1
IFO 0648	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6.0	0.0	6.3	72.9

K : 京都大学保存株

FOH : ファルネソール

GGOH : ゲラニルゲラニオール

【0 0 4 3】

【表 8】

培地組成：YM (Difco 製) 培地 + 5 % グルコース + 1 % 大豆油

菌株 No.	菌 株 属 種	培養日数	培養上清画分 ( $\mu\text{g/L}$ 培養液)		菌体画分	
			FOH	GGOH	FOH	GGOH
K 4104	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	281.0	127.7	241.1	161.6
		6	338.2	186.9	155.3	132.2
IFO 2052	<i>Saccharomyces rosei</i>	3	220.0	98.0	305.9	140.2
		6	381.2	176.6	193.1	122.5
IFO 0565	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	49.3	16.0	88.0	78.2
		6	51.9	34.1	248.5	214.2
IFO 0941	<i>Williopsis saturnus</i>	3	54.8	22.6	255.3	169.3
	var. <i>saturnus</i>	6	88.3	33.1	363.2	220.9
IFO 1475	<i>Ogataea polymorpha</i>	3	60.9	69.1	113.5	127.2
		6	19.8	14.4	60.8	95.9
IFO 0648	<i>Kluyveromyces lactis</i>	3	28.5	37.8	61.8	91.1
		6	120.3	124.5	159.8	211.5

K : 京都大学保存株

FOH : ファルネソール

GGOH : ゲラニルゲラニオール

## 【0044】

## 〔実施例 4〕（培養条件の検討）

表 9、10 に示す各菌株を、YM 培地又は YM 培地に 5 % グルコース、1 % 大豆油を添加した培地に、それぞれエルゴステロール 4mg/L 及びスクアレン合成阻害剤 (SQAD) を 0 ~ 20mg/L を添加した培地にて培養し、同様にしてネロリドール、ゲラニルゲラニオール、ファルネソールの各生産量を調べた。結果を表 9、10 に併せて示す。

## 【0045】

また、表 11、12 に示す各菌株を、YM 培地に 1 % 大豆油、6 % グルコース、エルゴステロール 4mg/L 及びスクアレン合成阻害剤 (SQAD) を 0 mg/L 又は 20mg/L を添加した培地にて培養し、同様にしてネロリドール、ゲラニルゲラニオール、ファルネソールの各生産量を調べた。結果を表 11（培養上清画分）、表 12（菌体画分）に示す。



大豆油、グルコース、スクアレン合成阻害剤の添加によって、生産量が増加することがわかる。

【0046】

【表9】

培地組成：YM培地（Difco 製）+4mg/L エルゴステロール +0-20mg SQAD

菌株 No.	SQAD	日数	培養上清画分			菌体画分		
			(μg/L 培養液)					
			NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
IFO 0215	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Saccharomyces unisporus	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IFO 0538	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Saccharomyces cerevisiae	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	8.1	0.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IFO 0622	0	3	0.0	3.1	0.0	0.0	1.9	30.4
Candida glabrata	1		0.0	3.5	0.0	0.0	1.4	24.3
	20		0.0	243.5	0.0	0.0	212.0	57.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	5.5	40.5
IFO 0717	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Yarrowia lopolytica	1		0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	39.7	66.5	0.0	39.7	63.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	2.1	0.0	0.0	1.5	0.0
	20		0.0	10.6	0.0	0.0	10.6	0.0
IFO 0948	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Komagataella	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	3.4	2.3	0.0	3.4	1.8
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

【0047】

(表9 続き)

IFO 0974	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Kuraishia	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
capsulata	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IFO 1472	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ogataea	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
glucozyma	20		0.0	0.0	18.3	0.0	0.0	17.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.8
IFO 1892	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.9
Saccharomyces	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.7
kluyeri	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IFO 1910	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Candida	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
cariosilignicola	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IFO 0005	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0
Candia	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3
glabrata	20		0.0	33.8	2.7	0.0	0.0	53.7
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	20.5	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

I : IFO菌株

NE : ネロリドール FOH : ファルネソール GGOH : ゲラニルゲラニオール

SQAD : スクアレン合成阻害剤 0 ; 無添加 1 ; 1mg/L 20 ; 20mg/L

【0048】

【表 1 0】

培地組成：YM培地 (Difco 製) + 5 % グルコース + 1 % 大豆油 +  
4mg/L エルゴステロール + 0-20mg SQAD

菌株 No.	培養上清画分					菌体画分		
	SQUAD 日数		NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
(μg/L 培養液)								
IFO 0215	0	3	16.3	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Saccharomyces unisporus	1		12.2	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		67.4	68.4	0.0	0.0	16.9	0.0
	0	7	19.6	14.8	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		27.3	17.5	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		466.6	433.7	21.6	8.6	255.6	0.0
IFO 0538	0	3	0.0	139.3	59.8	0.0	0.0	0.0
Saccharomyces cerevisiae	1		0.0	102.9	46.2	0.0	15.5	0.0
	20		65.9	9087.5	331.6	0.0	1465.9	51.0
	0	7	0.0	426.4	246.7	0.0	38.0	0.0
	1		0.0	319.5	241.0	0.0	188.8	85.6
	20		216.2	34241.4	1568.8	18.4	5812.1	266.2
IFO 0622	0	3	0.0	106.1	112.3	0.0	28.8	33.6
Candida glabrata	1		9.4	149.2	119.7	0.0	9.7	0.0
	20		422.2	12186.9	327.2	0.0	331.6	9.3
	0	7	11.6	378.3	408.5	0.0	43.7	59.2
	1		17.2	530.0	231.5	0.0	133.3	58.5
	20		1256.9	22147.1	862.7	138.0	2750.6	170.5
IFO 0717	0	3	0.0	8.7	0.0	0.0	6.7	0.0
Yarrowia lopolytica	1		2.4	100.1	19.1	0.0	165.3	0.0
	20		19.0	983.3	17.8	0.0	882.1	0.0
	0	7	0.0	95.3	608.0	0.0	0.0	38.4
	1		19.0	405.4	546.8	0.0	0.0	0.0
	20		156.7	6812.9	76.2	0.0	1025.1	41.8
IFO 0948	0	3	0.0	73.5	78.9	0.0	13.8	42.3
Komagataella pastoris	1		0.0	82.2	71.5	0.0	22.9	28.4
	20		17.2	2956.2	132.5	0.0	608.4	80.1
	0	7	0.0	101.6	83.5	0.0	4.3	11.0
	1		0.0	569.8	235.7	0.0	53.4	28.2
	20		34.2	5513.3	360.4	0.0	537.5	84.5

## 【 0 0 4 9 】

(表 1 0 続 き)

IFO 0974	0	3	0.0	24.8	11.1	0.0	3.3	0.0
Kuraishia	1		0.0	1061.9	46.1	0.0	16.1	7.5
capsulata	20		0.0	2022.7	262.0	0.0	149.2	34.8
	0	7	0.0	167.5	236.3	0.0	3.2	8.5
	1		0.0	713.7	275.7	0.0	24.8	21.2
	20		35.9	8268.5	680.4	0.0	362.1	59.7
IFO 1472	0	3	0.0	34.8	79.8	0.0	7.4	20.4
Ogataea	1		0.0	40.5	86.0	0.0	3.7	9.5
glucozyma	20		0.0	808.8	278.7	0.0	41.1	37.5
	0	7	0.0	63.2	138.8	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	93.8	114.7	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	1832.0	513.0	0.0	73.7	52.6
IFO 1892	0	3	0.0	70.4	46.1	0.0	3.7	0.0
Saccharomyces	1		0.0	51.4	23.0	0.0	2.3	0.0
kluyeri	20		0.0	62.9	30.7	0.0	16.5	0.0
	0	7	0.0	158.5	71.4	0.0	0.0	0.0
	1		23.5	188.3	101.7	0.0	5.0	0.0
	20		44.1	935.3	126.4	0.0	227.8	27.8
IFO 1910	0	3	0.0	11.0	44.7	0.0	0.0	0.0
Candida	1		0.0	20.9	69.3	0.0	0.0	0.0
carosilignicola	20		0.0	124.9	127.1	0.0	8.1	19.6
	0	7	0.0	51.7	152.9	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	257.7	367.3	0.0	10.3	37.4
	20		0.0	14378.1	2997.2	0.0	845.5	205.0
IFO 0005	0	3	22.9	552.1	496.1	0.0	50.5	75.2
Candia	1		260.0	6784.9	818.5	8.6	462.0	86.5
glabrata	20		2384.0	37513.9	1022.9	423.9	9405.0	306.5
	0	7	77.1	1676.1	1434.6	0.0	41.2	51.2
	1		546.0	11219.5	1377.8	9.2	331.7	77.1
	20		6208.9	68495.6	3228.1	139.2	2682.5	217.6

NE : ネロリドール

FOH : ファルネソール

GGOH : ゲラニルゲラニオール

SQAD : スクアレン合成阻害剤 0 ; 無添加 1 ; 1mg/L 20 ; 20mg/L

## 【 0 0 5 0 】

【表 1 1】

培地組成：YM 又は KB 又は KY 培地 + 1%大豆油 + 6%グルコース + 4mg/L エルゴステロール

培地	菌株 No.	培養上清画分 (μg/L)			
		SQAD	NE	FOH	GGOH
YM	IFO 0107	0	0.0	10.8	155.2
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	20	0.0	9.7	386.5
KB	K 0876	0	0.0	29.0	0.0
	<i>Pseudomonas sp.</i>	20	0.0	7.8	0.0
YM	IFO 1665	0	0.0	4.7	211.5
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	20	0.0	94.5	4214.9
YM	IFO 1744	0	0.0	0.0	155.5
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	20	0.0	41.1	3870.1
KB	K 2103	0	0.0	10.9	0.0
	<i>Norcadia asteroides</i>	20	0.0	0.0	0.0
KY	IFO 4570	0	0.0	0.0	36.5
	<i>Mucor Javanicus</i>	20	0.0	38.8	343.6
KY	K 4003	0	30.1	511.9	694.7
	<i>Saccharomyces Hafe logos</i> van Laer	20	4980.0	56541.1	3603.4
KY	K 4045	0	148.1	870.4	766.8
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	24606.3	37772.7	2590.6
KY	K 4102	0	17.5	541.1	711.3
	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	20	18160.8	50245.8	3207.1
KY	K 4103	0	56.4	753.1	1072.8
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	20930.8	53814.6	4589.9
KY	K 4104	0	19.5	569.2	546.0
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	23620.7	54713.2	2654.4
KY	IFO 0565	0	0.0	411.7	535.2
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	839.9	45723.6	2216.6
KY	IFO 0210	0	37.5	685.5	362.8
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	25251.0	48795.6	1627.2
KY	IFO 0346	0	0.0	196.2	278.9
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	20	757.6	45282.1	1153.6
KY	IFO 1475	0	0.0	236.9	462.7
	<i>Ogataea polymorpha</i>	20	0.0	5643.0	1195.1

【0051】

(表11 続き)

KY	JCM 2169	0	0.0	809.8	241.2
	Debaryomyces vanriijiae	20	129.5	20359.5	2236.0
	var vanriijiae				
KY	IFO 0339	0	0.0	164.4	364.3
	Saccharomyces ludwigii	20	131.0	28498.6	1483.8
KY	IFO 0115	0	0.0	254.9	493.6
	Hanseniaspora valbyensis	20	182.6	26807.1	1217.7
	Valbyensis				
KY	IFO 0648	0	0.0	136.4	433.8
	Kluyveromyces lactis	20	348.6	31785.7	3343.8
KY	IFO 0005	0	192.8	861.5	909.0
	Candida glabrata	20	15504.1	44573.8	2237.1
KY	IFO 0762	0	37.0	274.7	384.4
	Candida solani	20	1702.8	6574.7	619.1
KY	IFO 1527	0	0.0	16.6	24.7
	Cryptococcus humicolus	20	0.0	49.6	33.4
KY	IFO 1116	0	0.0	199.3	315.7
	Wickerhamia fluorescens	20	73.2	12200.1	1181.6

NE: ネロリドール

FOH: ファルネソール

GGOH: ゲラニルゲラニオール

SQAD: スクアレン合成阻害剤 0; 無添加 20; 20mg/L

フォスファターゼ処理有り

【0052】

【表 1 2】

培地組成：YM 又は KB 又は KY 培地 + 1%大豆油 + 6%グルコース + 4mg/L エルゴステロール

培地	菌株 No.	菌体画分 ( $\mu\text{g/L}$ )			
		SQAD	NE	FOH	GGOH
YM	IFO 0107	0	0.0	8.1	24.6
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	20	0.0	4.8	79.9
KB	K 0876	0	0.0	0.0	0.0
	<i>Pseudomonas sp. H21</i>	20	0.0	0.0	0.0
YM	IFO 1665	0	0.0	8.2	21.7
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	20	0.0	20.8	228.9
YM	IFO 1744	0	0.0	0.0	42.2
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	0	0.0	29.8	819.1
KB	K 2103	0			
	<i>Norcadia asteroides</i>	20			
KY	IFO 4570	0	13.4	22.7	17.5
	<i>Mucor Javanicus</i>	20	0.0	15.6	61.7
KY	K 4003	0	0.0	36.9	52.4
	<i>Saccharomyces Hafe logos van Laer</i>	20	291.8	7433.0	710.6
KY	K 4045	0	0.0	69.3	65.8
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	3022.6	7893.0	534.5
KY	K 4102	0	0.0	36.4	76.3
	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	20	1350.0	6358.2	396.5
KY	K 4103	0	0.0	591.7	39.4
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	1073.6	5528.9	369.6
KY	K 4104	0	0.0	51.6	79.2
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	2409.9	11464.9	656.2
KY	IFO 0565	0	0.0	40.2	54.7
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	57.3	5071.6	333.5
KY	IFO 0210	0	0.0	119.4	89.6
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	1698.7	4355.2	183.2
KY	IFO 0346	0	0.0	29.7	82.6
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	20	83.1	4826.5	159.4
KY	IFO 1475	0	0.0	31.4	126.0
	<i>Ogataea polymorpha</i>	20	19.8	1196.1	402.7

## 【0053】

(表12 続き)

KY	JCM 2169	0	0.0	67.2	54.3
	<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	20	23.9	2807.0	492.6
	var <i>vanriijiae</i>				
KY	IFO 0339	0	0.0	41.6	114.7
	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	20	0.0	3217.2	199.4
KY	IFO 0115	0	0.0	25.2	76.6
	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	20	15.1	2823.5	185.8
	<i>Valbyensis</i>				
KY	IFO 0648	0	0.0	20.9	84.6
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	20	14.5	1128.6	225.8
KY	IFO 0005	0	0.0	34.9	51.7
	<i>Candida glabrata</i>	20	1193.0	4710.9	279.6
KY	IFO 0762	0	16.2	90.5	126.0
	<i>Candida solani</i>	20	231.3	962.5	350.0
KY	IFO 1527	0	7.8	16.0	0.0
	<i>Cryptococcus humicolus</i>	20	21.2	160.9	51.9
KY	IFO 1116	0	0.0	15.0	86.5
	<i>Wickerhamia fluorescens</i>	20	32.6	4262.8	500.7

NE: ネロリドール

FOH: ファルネソール

GGOH: ゲラニルゲラニオール

SQAD: スクアレン合成阻害剤 0; 無添加 20; 20mg/L

フォスファターゼ処理有り

## 【0054】

〔実施例5〕 (培地条件の検討)

ファルネソールが検出されたバクテリアに関し、KB培地に1%大豆油、4mg/L エルゴステロール、スクアレン合成阻害剤(SQAD)を0又は20mg/Lを添加した培地にてそれぞれ培養し、同様にしてネロリドール、ゲラニルゲラニオール、ファルネソールの各生産量を調べた。結果を表13に示す。バクテリアの場合も酵母と同様に、スクアレン合成阻害剤の添加によって生産量が増大することがわかる。

## 【0055】



【表 13】

培地組成：KB培地+1%大豆油+10<sup>3</sup> ステロール

菌株 No.	培養上清画分				菌体画分		
	(μg/L 培養液)				NE	FOH	GGOH
IFO 3032	0	0.0	11.6	0.0	0.0	0.0	0.0
Bacillus	20	0.0	22.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Amyloliuefaciens							
IFO 3030	0	0.0	21.9	0.0	0.0	0.0	0.0
Bacillus pumilus	20	0.0	36.6	0.0	0.0	6.0	0.0
IFO 3762	0	0.0	6.8	0.0	0.0	11.2	0.0
Staphylococcus	20	0.0	121.4	0.0	0.0	292.4	0.0
Epidermidis							
IFO 3067	0	0.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Micrococcus	20	0.0	57.3	0.0	0.0	11.8	0.0
Lutetus							
IFO 12146	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Exiguobacterium	20	0.0	115.7	0.0	0.0	10.4	0.0
Acetylicum							

NE：ネロリドール

FOH：ファルネソール

GGOH：ゲラニルゲラニオール

SQAD：スクアレノ合成阻害剤 0；無添加 20；20mg/L

フォスファターゼ処理有り

【0056】

【発明の効果】

本発明によれば、テルペン類、カロチノイド類、ステロイド類の生合成中間体として有用なゲラニルゲラニオール、ファルネソール、ネロリドール生産能を有する微生物を利用して、大量にかつ安価にゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物を製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 ゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物を生産することのできる酵母菌（子囊菌酵母類、不完全菌酵母類）、細菌、放線菌、糸状菌を培地に培養し、ゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物を菌体内外に生成蓄積せしめ、これらを採用することを特徴とする、ゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物の製造方法。

【効果】 本発明によれば、テルペン類、カロチノイド類、ステロイド類の生合成中間体として有用なゲラニルゲラニオール、ファルネソール、ネロリドール生産能を有する微生物を利用して、大量にかつ安価にゲラニルゲラニオール及びその類縁化合物を製造することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 3 2 0 7 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 7 日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県豊田市トヨタ町1番地
氏 名	トヨタ自動車株式会社